

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-245492
(43)Date of publication of application : 12.09.2000

(51)Int.CI.

C12P 9/00
A01N 63/02
A23J 7/00
B01F 17/14
C07F 9/10

(21)Application number : 11-053766

(71)Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 02.03.1999

(72)Inventor : UNO KAZUTAKA
KAGEYAMA IKUKO
YAMAMOTO KAZUHIRO

(54) LIPID EXTRACTED FROM MICROORGANISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a lipid including a specific amount of a phospholipid including a basic phospholipid used for surfactant or the like for foods, cosmetics, medicines or the like by culturing a microorganism and extracting the produced fungus body using a polar solvent.

SOLUTION: The subject lipid extracted from microorganism including $\geq 10\text{wt.\%}$ of phospholipid including a basic phospholipid used for surfactant, especially emulsifier, age resistor for starch, antimicrobial agent and base material for liposome or the like for foods, cosmetics, medicines or the like is obtained by culturing microorganisms selected from microorganisms belonging to genus *Bacillus*, genus *Streptococcus* and genus *Lactobacillus*, extracting the produced fungus body with one or more kind of polar solvents selected from ethanol, methanol, acetone, diethyl ether or chloroform and treating the lipid extracted from microorganism by an enzyme such as phospholipase A2 or the like.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-245492
(P2000-245492A)

(43)公開日 平成12年9月12日(2000.9.12)

(51)Int.Cl.⁷
C 12 P 9/00
A 01 N 63/02
A 23 J 7/00
B 01 F 17/14
C 07 F 9/10

識別記号

F I
C 12 P 9/00
A 01 N 63/02
A 23 J 7/00
B 01 F 17/14
C 07 F 9/10

デマコード*(参考)
4 B 0 6 4
E 4 D 0 7 7
4 H 0 1 1
4 H 0 5 0
A

審査請求 未請求 請求項の数23 O L (全 10 頁)

(21)出願番号 特願平11-53766

(22)出願日 平成11年3月2日(1999.3.2)

(71)出願人 000001029
協和醸酵工業株式会社
東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 宇野 和孝
茨城県稲敷郡阿見町阿見4041 協和醸酵工
業株式会社食品酒類研究所内

(72)発明者 影山 郁子
茨城県稲敷郡阿見町阿見4041 協和醸酵工
業株式会社食品酒類研究所内

(72)発明者 山元 一弘
東京都千代田区大手町1丁目6番1号 協
和醸酵工業株式会社本社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微生物抽出脂質

(57)【要約】

【課題】 天然物由来の塩基性リン脂質を含む微生物抽出脂質、ならびに該リン脂質を含有する界面活性剤、特に乳化剤、澱粉老化抑制剤、抗微生物剤およびリポソーム基材を提供する。

【解決手段】 微生物の菌体より抽出され、かつ塩基性リン脂質を含むリン脂質を10重量%以上含有する微生物抽出脂質、該微生物抽出脂質の製造方法、該微生物抽出脂質を酵素で処理して得られる酵素処理微生物抽出脂質、該微生物抽出脂質または該酵素処理微生物抽出脂質を含有する界面活性剤、乳化剤、澱粉老化抑制剤、抗微生物剤およびリポソーム基材、ならびに該微生物抽出物質または該酵素処理微生物抽出脂質から精製して得られる塩基性リン脂質を含有するリポソーム基材に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物の菌体より抽出され、かつ塩基性リン脂質を含むリン脂質を10重量%以上含有する微生物抽出脂質。

【請求項2】 塩基性リン脂質を0.5重量%以上含む請求項1記載の微生物抽出脂質。

【請求項3】 塩基性リン脂質が塩基性アミノアシルリン脂質である請求項1または請求項2記載の微生物抽出脂質。

【請求項4】 塩基性アミノアシルリン脂質がホスファチジルグリセロールの塩基性アミノ酸エステルである請求項3記載の微生物抽出脂質。

【請求項5】 ホスファチジルグリセロールの塩基性アミノ酸エステルがリジルホスファチジルグリセロールまたはオルニチルホスファチジルグリセロールである、請求項4記載の微生物抽出脂質。

【請求項6】 微生物が菌体内に塩基性リン脂質を含有する微生物である、請求項1～5のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質。

【請求項7】 微生物が細菌、酵母またはカビである、請求項1～6のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質。

【請求項8】 微生物がバチルス(*Bacillus*)属、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属およびラクトバチルス(*Lactobacillus*)属から選ばれる属に属する微生物である、請求項1～6のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質。

【請求項9】 微生物がバチルス・ズブチルス(*Bacillus subtilis*)、バチルス・ナットウ(*Bacillus natto*)、バチルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)、バチルス・リチニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)、バチルス・セレウス(*Bacillus cereus*)、ストレプトコッカス・フェカリス(*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・デュランス(*Streptococcus durans*)、ストレプトコッカス・ファシウム(*Streptococcus faecium*)、ストレプトコッカス・アガラクティア(*Streptococcus agalactiae*)、ラクトバチルス・ブルガリカス(*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバチルス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・プランタラム(*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ファーメンタム(*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバチルス・ラクティス(*Lactobacillus lactis*)およびラクトバチルス・アシドフィラス(*Lactobacillus acidophilus*)から選ばれる微生物である、請求項1～6のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質。

【請求項10】 微生物の菌体より極性溶媒を用いて抽出される、請求項1～9のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質。

【請求項11】 極性溶媒がエタノール、メタノール、アセトン、ジエチルエーテルまたはクロロホルムから選ばれる1種以上の溶媒である、請求項10記載の微生物

抽出脂質。

【請求項12】 請求項1～9のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質の製造方法であって、微生物を培養して得られる菌体より極性溶媒を用いて抽出することを特徴とする微生物抽出脂質の製造方法。

【請求項13】 溶媒がエタノール、メタノール、アセトン、ジエチルエーテルまたはクロロホルムから選ばれる1種以上の溶媒である、請求項12記載の微生物抽出脂質の製造方法。

【請求項14】 請求項1から請求項11までのいずれか一項に記載の微生物抽出脂質を酵素で処理して得られる酵素処理微生物抽出脂質。

【請求項15】 酵素がホスホリパーゼA₂、ホスホリパーゼA₂'、ホスホリパーゼCおよびホスホリパーゼDから選ばれる1種以上の酵素である、請求項14記載の酵素処理微生物抽出脂質。

【請求項16】 酵素がペプチダーゼ、プロテアーゼおよびトランスクルタミナーゼから選ばれる1種以上の酵素である請求項14記載の酵素処理微生物抽出脂質。

【請求項17】 請求項1～11のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質または請求項14～16のいずれか一項に記載の酵素処理微生物抽出脂質を含有する界面活性剤。

【請求項18】 請求項1～11のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質または請求項14～16のいずれか一項に記載の酵素処理微生物抽出脂質を含有する乳化剤。

【請求項19】 請求項1～11のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質または請求項14～16のいずれか一項に記載の酵素処理微生物抽出脂質を含有する澱粉老化抑制剤。

【請求項20】 請求項1～11のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質または請求項14～16のいずれか一項に記載の酵素処理微生物抽出脂質を含有する抗微生物剤。

【請求項21】 請求項1～11のいずれか一項に記載の微生物抽出脂質または請求項14～16のいずれか一項に記載の酵素処理微生物抽出脂質を含有するリポソーム基材。

【請求項22】 請求項1～11のいずれか一項に記載の微生物抽出物質または請求項14～16のいずれか一項に記載の酵素処理微生物抽出脂質から精製して得られる塩基性リン脂質を含有するリポソーム基材。

【請求項23】 塩基性リン脂質がリジルホスファチジルグリセロールである請求項22記載のリポソーム基材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、食品、化粧品、医薬品等に用いられる界面活性剤として有用な、微生物の菌体から抽出して得られる塩基性脂質に関する。

【0002】

【従来の技術】リン脂質は分子中に親水性および疎水性領域を有することにより界面活性を有する物質であり、生体の構成成分としてだけでなく、生理的機能においても極めて重要な役割を担っている。また、界面活性を有する物質は化学合成により多種類のものが製造されている。これら界面活性を有する物質は、界面活性剤として、天然物もしくは化学合成物を問わず飲食品、化粧品および医薬品等幅広い産業分野で用いられている。

【0003】界面活性剤の特性は、分子種、分子の疎水性のバランス、立体構造的形状および油水界面における荷電状態等により大きく変化する。このため、界面活性剤には多種多様な特性を持つものがあり、その用途により選択や使い分けがなされている。天然物由來の界面活性剤としては、起源を微生物に求めた、いわゆるバイオサーファクタントが報告されている〔油化学45(10), 1013(1996)〕。バイオサーファクタントは従来の化学合成によって得られる界面活性剤とは異った構造や機能を示すのみならず、生分解性、低毒性、種々の生物活性といった独特な特性を有することから、資源、環境、安全の面でも期待されている。

【0004】しかし、バイオサーファクタントとしては、菌体外の分泌物が多く利用されており、菌体抽出脂質は利用されていない。また、従来のバイオサーファクタントの多くは非イオン性または酸性であり、塩基性のものはほとんどない〔Biosurfactants and Biotechnology, Surface Science Series 25, Marcel Dekker, Inc., 41 (1987)〕。

【0005】食品工業においては、健康嗜好、イメージの観点から天然物の界面活性剤の使用が要求されており、中でもリン脂質の一種であるレシチンが注目されている。また、乳化性向上を目的としてホスホリパーゼA₂処理によるリゾutan化レシチンの開発が進んでおり、実際に実用化もされている〔フードケミカル, 3(21), 51 (1987)〕。さらに、ホスホリパーゼDによりリン脂質の親水性頭部をグリセリンと置換してホスファチジルグリセロール濃度の高いレシチンとして乳化性を向上させるような研究がなされており、乳化をはじめリン脂質の機能における親水性頭部の重要性が示唆されている〔Bio Industry, 7(7), 494 (1990)〕。

【0006】しかし、現在食品工業の分野において用いられているリン脂質系の乳化剤は、両イオン性または酸性を呈するものしかなく、塩基性を呈するものはない。生澱粉を適量の水存在下で、所定の温度以上に加熱すると、結晶状態が変化して糊化する。糊化した澱粉は、経時に再結晶化、すなわち老化する。パン、ケーキ等の製菓・製パン、および米飯加工食品の分野では、加工後の保存中における澱粉の老化による品質劣化が大きな問題となっている。澱粉の老化現象を抑制する方法として、糊化澱粉が老化する過程において澱粉老化抑制剤を

存在させる方法が知られている。

【0007】食品添加物に用いられる澱粉老化抑制剤としては、モノ脂肪酸グリセライドが知られている。しかし、モノ脂肪酸グリセライドは化学合成により製造されるものであるため、天然物由來の澱粉老化抑制剤の開発が望まれている。ペプチド系抗生物質であるグラミシン、哺乳類の生体防御物質であるディフェンシン、および食品用鮮度保持剤として広く用いられているポリリジンやプロタミン等に代表されるペプチド類は抗微生物活性を有することが知られている。これらの物質は、塩基性を呈するために負に荷電した菌体表面への親和性が高く、また両親媒性構造を有するために標的微生物の菌体膜に傷害を与えることにより、食品汚染菌等の微生物を死滅させると考えられている〔Science, 251, 1481 (1991)、Appl. Env. Microbiol., 63(3), 1155 (1997)〕。このため、塩基性両親媒性構造を有する抗微生物剤の開発が望まれている。

【0008】医薬品の分野において、投与した薬剤を薬効を損なうことなく標的とする臓器まで輸送する必要がある場合、人工脂質二重層（リポソーム）に包含させた形態で投与する方法がある。その場合、包含薬物、温度、pHなど各種条件下におけるリポソームの安定性、細胞への滞留性および浸透性等には、リポソーム基材となる脂質の性質が大きく関与することが知られている。

【0009】核酸の輸送には、N-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)プロピル]-N, N, N-トリエチルアソニウムやステアリルアミン等、化学合成によって得られる塩基性脂質を用いたリポソームが適するとの報告がある〔Mol. Cell Biochem., 120, 119 (1993)、Biochim. Biophys. Acta, 1306, 55 (1996)〕。しかし、これらの塩基性脂質は化学合成により製造された脂質であることから、生体への安全性が懸念されており、安全性の高い塩基性脂質の開発が望まれている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、天然物由來の塩基性リン脂質を含む微生物抽出脂質、ならびに該リン脂質を含有する界面活性剤、特に乳化剤、澱粉老化抑制剤、抗微生物剤およびリポソーム基材を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、微生物の菌体より抽出され、かつ塩基性リン脂質を含むリン脂質を10重量%以上含有する微生物抽出脂質、該微生物抽出脂質の製造方法、該微生物抽出脂質を酵素で処理して得られる酵素処理微生物抽出脂質、該微生物抽出脂質または該酵素処理微生物抽出脂質を含有する界面活性剤、乳化剤、澱粉老化抑制剤、抗微生物剤およびリポソーム基材、ならびに該微生物抽出脂質または該酵素処理微生物抽出脂質から精製して得られる塩基性リン脂質を含有するリポソーム基材に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明の微生物抽出脂質は、微生物の培養菌体より抽出され、かつ塩基性リン脂質を含むリン脂質を10重量%以上含有するところに特徴を有するものである。本発明に用いられる微生物としては、微生物の菌体内に塩基性リン脂質を含有する微生物であることが好ましい。このような微生物としては、細菌、酵母またはカビ等があげられ、バチルス(*Bacillus*)属、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属またはラクトバチルス(*Lactobacillus*)属に属する微生物が好適に用いられる。

【0013】特に好ましい微生物としては、バチルス・ズブチルス(*Bacillus subtilis*)、バチルス・ナットウ(*Bacillus natto*)、バチルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)、バチルス・リチニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)、バチルス・セレウス(*Bacillus cereus*)、ストレプトコッカス・フェカリス(*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・デュランス(*Streptococcus durans*)、ストレプトコッカス・ファシウム(*Streptococcus faecium*)、ストレプトコッカス・アガラクティア(*Streptococcus agalactiae*)、ラクトバチルス・ブルガリカス(*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバチルス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・プランタラム(*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ファーメンタム(*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバチルス・ラクティス(*Lactobacillus lactis*)およびラクトバチルス・アシドフィラス(*Lactobacillus acidophilus*)等があげられる。

【0014】本発明の微生物抽出脂質は、上記微生物を所定の培地と培養条件にて培養し、得られる菌体より抽出することにより製造することができる。培地としては、上記微生物が資化できる炭素源、窒素源、無機塩類等を含有する培地であれば、特に限定されるものではなく、また天然培地、合成培地のいずれの培地を用いてもよい。

【0015】炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびにペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーピリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

【0016】無機物としては、リン酸第一カリウム、リ

ン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養条件としては、上記微生物の培養に適した条件であれば特に制限されるものではなく、静置培養などの嫌気条件でも振盪培養などの好気的条件であってもよい。

【0017】本発明の微生物抽出脂質は、以下の方法により菌体より抽出することができる。培養終了後、培地から遠心分離装置、沪過装置等を用いて菌体を分離する。分離した菌体に溶媒を加え、ホモジナイザーを用いて菌体を粉碎する。粉碎した菌体を固液分離して溶媒可溶性画分を得る。溶媒不溶性画分について同様な操作を数回繰り返すことにより、リン脂質を選択的に回収することができる。得られた溶媒可溶画分から、溶媒を真空乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥等の処理を行って除去することにより、本発明の微生物抽出脂質を取得することができる。

【0018】抽出に用いる溶媒としては、極性溶媒が好ましく、エタノール、メタノール、アセトン、ジエチルエーテルまたはクロロホルムがさらに好ましく、エタノール、メタノール、クロロホルムが特に好ましい。本発明の微生物抽出脂質は、塩基性リン脂質を含むリン脂質を10重量%以上含有するが、界面活性剤として用いる場合、塩基性リン脂質を含むリン脂質を10～80重量%含有することが好ましく、15～50重量%含有することがさらに好ましい。

【0019】本発明において、塩基性リン脂質とは分子中に存在する解離基の電荷の総和が正であるリン脂質を示す。塩基性リン脂質としては、塩基性アミノアシリリン脂質が好ましく、ホスファチジルグリセロールの塩基性アミノ酸エステルが特に好ましい。ホスファチジルグリセロールの塩基性アミノ酸エステルとしては、リジルホスファチジルグリセロール(lysylphosphatidylglycerol:以下、LPGと略記する)またはオルニチルホスファチジルグリセロール(ornitylphosphatidylglycerol:以下、OPGと略記する)が好ましく、LPGが特に好ましい。

【0020】LPGは、バチルス属、ストレプトコッカス属、ラクトバチルス属、クロストリディウム(*Clostridium*)属、スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)属等に属する微生物の菌体に含まれる塩基性リン脂質であり、ホスファチジルグリセロールのヒドロキシル基にリジンのカルボキシル基がエステル結合した構造を有し、中性域で塩基性を示すリン脂質である。

【0021】OPGは、ホスファチジルグリセロールのヒドロキシル基にオルニチンのカルボキシル基がエステル結合した構造を有するリン脂質である。本発明の微生物抽出脂質は、塩基性リン脂質を0.5重量%以上含有することが好ましく、1～50重量%含有することがさらに好ましく、1～20重量%含有することが特に好ま

しい。

【0022】本発明の微生物抽出脂質は、塩基性リン脂質を含む以外は、ホスファチジルコリン（レシチン）、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、スフィンゴリンミエリン等、いずれのリン脂質を含んでいてもよい。

【0023】微生物抽出粗脂質は、そのまま界面活性剤として用いてもよいし、さらに精製して得られる塩基性リン脂質を界面活性剤として用いてもよい。塩基性リン脂質の精製法としては、例えばケイ酸カラムを用いてクロロホルム／メタノールの溶出溶媒系でメタノール濃度を徐々に上昇させて分画溶出させる方法等があげられる。この場合、必要に応じて溶出溶媒に酢酸等の有機酸、あるいはアンモニア水等を添加してもよい。

【0024】以下に、本発明の酵素処理微生物抽出脂質について説明する。本発明の酵素処理微生物抽出脂質は、本発明の微生物抽出脂質を酵素処理することにより製造することができる。酵素処理には、ホスホリバーゼA₁、ホスホリバーゼA₂、ホスホリバーゼC、ホスホリバーゼD等のホスホリバーゼ類、またはペプチダーゼ、プロテアーゼ、トランスクルタミナーゼ等のペプチド結合もしくはアミド結合に関与する酵素が好適に用いられる。

【0025】ホスホリバーゼ類としては、ホスホリバーゼA₁またはA₂が、リン脂質をリゾ態化させて親水性を向上させられるため、好適に用いられる。ペプチド結合もしくはアミド結合に関与する酵素は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン等の両性リン脂質のアミノ基に、塩基性アミノ酸のカルボキシル基を結合させることができる。このため、該酵素で処理することにより、微生物抽出脂質に含まれるリン脂質中の塩基性リン脂質の含有量を増大させることができる。

【0026】上記酵素としては、動物、植物または微生物由来のいずれのものを用いてもよいが、豚臍臓由来のホスホリバーゼA₁またはA₂、バチルス・ズブチルス由来のホスホリバーゼC、キャベツ、ピーナッツまたはアクチノマツラ (*Actinomadura*) s p. 由来のホスホリバーゼD、バチルス・ズブチルス、アスペルギルス・オリザ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガ (*Aspergillus niger*) またはリゾバス (*Rhizopus*) 属由来のペプチダーゼまたはプロテアーゼ、ストレプトファーティシリウム・モバラエンス (*Streptoverticillium moharaense*) 由来のトランスクルタミナーゼ等が好適に用いられる。

【0027】本発明の微生物抽出脂質または酵素処理微生物抽出脂質を含有する界面活性剤（以下、本発明の界面活性剤という）の用途としては、例えば乳化剤、澱粉老化抑制剤、抗微生物剤、リポソーム基材等があげられ

る。本発明の微生物抽出脂質または酵素処理微生物抽出脂質を含有する乳化剤（以下、本発明の乳化剤という）は、これを乳化液の調製に用いることで、酸性域でも粒径の小さい安定なエマルジョンを形成させることができ。本発明の乳化剤のうち、酵素処理微生物抽出脂質を含有する乳化剤は、親水性が向上しているため、形成したエマルジョンの安定性の面で特に好ましい。

【0028】本発明の乳化剤には、必要に応じて添加剤を加えてもよく、他の乳化剤と併用してもよい。本発明の乳化剤を用いて乳化液を調製するためには、基油となる油相に本発明の乳化剤を添加してこれを原液とし、原液に水相を加えて攪拌する等、通常の乳化液の調製方法を用いればよい。本発明の乳化剤を用いて乳化液を調製する場合、形成したエマルジョンの安定性の面から、本発明の乳化剤を油相重量に対して0.25重量%以上添加することが好ましく、0.25～50.0重量%添加することがより好ましく、0.5～25.0重量%添加することが特に好ましい。また、本発明の乳化剤を用いて乳化液を調製する場合、必要に応じて酸化防止剤、消泡剤等の添加剤を添加してもよい。

【0029】微生物抽出脂質または酵素処理微生物抽出脂質を含有する澱粉老化抑制剤（以下、本発明の澱粉老化抑制剤という）は、これを澱粉に添加することにより、澱粉の老化を抑制することができる。本発明の澱粉老化抑制剤は、澱粉老化抑制効果が高くかつ天然由来であることから食品添加物として好適に用いることができる。

【0030】本発明の澱粉老化防止剤には、必要に応じて添加剤を添加してもよい。また、本発明の澱粉老化防止剤は、予め生澱粉に添加しておいてもよく、また澱粉を糊化させる際に練り込んでよい。本発明の澱粉老化抑制剤は、澱粉の老化抑制効果の面から、澱粉重量に対して0.05重量%以上添加することが好ましく、0.05～10.0重量%添加することがより好ましく、0.1～5.0重量%添加することが特に好ましい。

【0031】本発明の微生物抽出脂質または酵素処理微生物抽出脂質を含有する抗微生物剤（以下、本発明の抗微生物剤という）は、これを食品、化粧品、医薬品、トイレタリー製品等に添加することにより、これらの系中の汚染微生物の増殖を抑制することができる。本発明の抗微生物剤は、微生物の増殖抑制効果の面から、食品等に対して0.05重量%以上添加することが好ましく、系中に0.05～10.0重量%添加することがより好ましく、0.1～5.0重量%添加することが特に好ましい。例えば炊飯時に白米に対して1.0重量%添加して炊飯することにより、保存性の向上した米飯を提供することができる。

【0032】本発明の微生物抽出脂質または酵素処理微生物抽出脂質を含有するリポソーム基材（以下、本発明のリポソーム基材という）を用いることにより、例えば

DNA、RNA等の核酸系薬剤の輸送に優れたリポソーム製剤を製造することができる。本発明のリポソーム基材としては、微生物抽出脂質または酵素処理微生物抽出脂質をさらに精製して得られる塩基性リン脂質、特にリジルホスファチジルグリセロールを用いてもよい。

【0033】本発明のリポソーム基材を用いたリポソームの製造には、例えば以下の方法が用いられる。本発明のリポソーム基材を、例えばクロロホルム／メタノール（2：1混液）等の適当な溶媒に溶解し、真空下あるいは窒素ガスの吹き付けにより溶媒を除去して脂質の薄膜を得る。薄膜に薬剤溶液を添加し、攪拌処理、超音波処理等をすることにより、薬剤を包含するリポソームを製造することができる。

【0034】本発明のリポソーム基材は、薬剤輸送機能の面から、系中に0.05重量%以上添加する方が好ましく、0.05～10.0重量%添加することがより好ましく、0.1～5.0重量%添加することが特に好ましい。以下、実施例により本発明を具体的に説明する。なお、実施例においては、特に記載しない限り%は重量%を示すものとする。

【0035】

【実施例】実施例1

バチルス・ズブチルスを、ペプトン1.0%、酵母エキス1.0%、食塩0.5%、リン酸塩0.04%、グルコース2.0%および硫安0.2%を含有する培地（pH7.0）に植菌し、37℃で16時間振盪培養した。培養終了後、培養液を5000×Gで10分間遠心分離して湿菌体を得た。得られた湿菌体より、B1igh & Dyerの方法 [Can. J. Biochem. Physiol., 37(8), 911 (1959)]に従い、微生物抽出脂質を取得した。

【0036】すなわち、湿菌体中に含まれる水分を体積分率で0.8部となるように調整し、これにクロロホルム2部およびメタノール1部を添加した後、ホモジナイザーで菌体を破碎した。これにクロロホルム1部および水1部を添加し、遠心分離して得られた下層を抽出液とし、抽出液を減圧乾燥させてバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-BD）乾燥物を取得した。さらに、BEL-BD乾燥物にアセトンを加えて十分に攪拌した後、固液分離によりアセトン可溶性画分を除て得られるバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-BDA）を取得した。

【0037】実施例2

実施例1記載の方法と同様の方法によりバチルス・ズブチルスの湿菌体を得た。得られた湿菌体に5倍重量のエタノールを加え、ホモジナイザーで菌体を破碎した。これを遠心分離して得られた上清を抽出液とし、抽出液を減圧乾燥させてバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-Et）を取得した。

【0038】実施例3

ストレプトコッカス・フェカリスをペプトン1.25

%、酵母エキス0.55%、グルコース1.1%、リン酸二水素カリウム0.025%、リン酸一水素カリウム0.025%、酢酸ナトリウム1.0%、硫酸マグネシウム0.01%、硫酸マンガン0.0005%、および硫酸第一鉄0.0005%を含有する培地（pH6.

8）に植菌し、37℃で16時間静置培養した。培養液を5000×Gで10分間遠心分離し、得られた菌体に5倍重量のエタノールを加えた後、ホモジナイザーで菌体を破碎した。これを遠心分離して得られた上清を抽出液とし、抽出液を減圧乾燥させてストレプトコッカス・フェカリス抽出脂質（SEL-Et）を取得した。

【0039】実施例4

20 mM塩化カルシウムを含有する50 mMリン酸緩衝液（pH8.0）に、実施例2記載の方法で得られたバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-Et）と豚臍臍由来パンクレアチン（キシダ化学社製）をそれぞれ1.0%となるように添加し、37℃で24時間反応させた。なお、パンクレアチン添加は、ホスホリパーゼA₂添加を目的とするものである。実施例1記載のB1igh & Dyer法に従い、反応物から抽出液を得て、これを減圧乾燥させて酵素処理バチルス・ズブチルス抽出脂質（lysoph BEL-Et）を取得した。

【0040】比較例1

抽出溶媒としてヘキサンを用いる以外は実施例2記載の方法と同様の方法によりバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-Hex）を取得した。

【0041】比較例2

大腸菌（Escherichia coli）をペプトン1.0%、酵母エキス0.2%、および硫酸マグネシウム7水和物0.1%を含有する培地（pH7.0）に植菌し、37℃で16時間静置培養した。培養終了後、培養液を5000×Gで10分間遠心分離して湿菌体を得た。得られた湿菌体に5倍重量のエタノールを加え、ホモジナイザーで菌体を破碎した。これを遠心分離して得られた上清を抽出液とし、抽出液を減圧乾燥させて大腸菌抽出脂質（EEL-Et）を取得した。

【0042】比較例3

圧搾酵母（ダイヤイースト：協和発酵工業社製）の菌体に5倍重量のエタノールを加え、ホモジナイザーで菌体を破碎した。これを遠心分離して得た上清を抽出液とし、抽出液を減圧乾燥させて酵母抽出脂質（YEL-Et）を取得した。

【0043】実施例5

実施例1記載の方法で得られたバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-BD）からケイ酸カラムを用いてクロロホルム／メタノール／酢酸の溶媒系で分離分画してLPGを精製した。なお、LPGの精製度の確認は高性能薄層クロマトグラフィー（HPTLC）分析により評価した。HPTLCの分析条件は、スポットする脂質を約10 μgとし、展開溶媒としては、クロロホルム／メタ

ノール／酢酸／水=125/37/9, 5/1, 5の混合溶媒を用いて展開した。検出は、Dittmer-Lester法〔薄層クロマトグラフィの実際、廣川書店(1990)〕に従い、モリブデンブルーでリンを、ニンヒドリン反応により遊離アミノ基を検出し、硫酸加熱による有機物の非特異的な検出で夾雜スポットのないことを確認した。

【0044】実施例6

実施例5記載の方法で得られる精製LPGをクロロホルムに溶解し、ロータリーエバボレーターにて減圧乾固させる。1.0%プラスミドDNA含有、20mMトリス、75mM塩化カリウム、75mM塩化ナトリウム緩衝液(pH7.4)を精製LPG濃度が0.85%となるように添加した後、激しく攪拌してリポソームを調製する。リポソームに含有されなかつたプラスミドDNAをSephadex G-25M(ファルマシア社製)

第1表

	実施例1		実施例2		実施例3		実施例4		比較例1		比較例2		比較例3	
	BEL-BD	BEL-Et	SEL-Et	lysobEL-BD	BEL-Hex	SEL-Et	YEL-Et							
リン脂質	29.2	14.7	12.3	26.0	3.4	15.8	13.1							
LPG	2.0	2.9	2.5	1.8*	0	0	0							

*: LPGのリゾ態を含む

単位 [%]

【0048】試験例2

10mMリン酸緩衝液(pH7.0)0.8gにサラダ油0.2gおよび実施例1で得られたバチルス・ズブチルス抽出脂質(BEL-BD)を5mg添加して、ULTRA TURRAX(IKA社製)にて20000rpm、50°Cで1分間乳化した。同緩衝液にて30倍に希釈して乳化液を調製した。

【0049】比較対照として、BEL-BDに代えて卵黄ホスファチジルコリン(99%; pure-PC)、大豆レシチン(crude-PC)および大豆リゾレシチン(lysoph-PC)を、それぞれ用いて乳化液を調製した。得られた乳化液について、Coulter model N4(コールター社製)を用いて平均粒径を測定した。

【0050】結果を第2表に示す。

【0051】

【表2】

第2表

	平均粒径 [nm]
BEL-BD	355
pure-PC	579
crude-PC	544
lysoph-PC	539

【0052】第2表に示されるとおり、バチルス・ズブチルス抽出脂質(BEL-BD)を用いて調製した乳化液は、大豆レシチン(crude-PC)、卵黄ホスファチジルコリン(pure-PC)および大豆リゾレシチン(lysoph-PC)をそれぞれ用いて調製した乳化液よりも、平均粒径の小さいエマルジョンを形成した。

【0053】試験例3

緩衝液として10mMリン酸緩衝液(pH7.0)の代わりに10mM酢酸緩衝液(pH4.0、5.0)およびリン酸緩衝液(pH6.0、7.0)をそれぞれ用い、比較対照として大豆リゾレシチン(lysoph-PC)を用いる以外は試験例2と同様な方法を用いて、乳化液の調製および平均粒子径の測定を行った。

【0054】結果を第3表に示す。

【0055】

【表3】

によりゲルろ過して除去し、リポソーム製剤を製造する。

【0045】試験例1

実施例1～4および比較例1～3で得られた微生物抽出脂質について、リン脂質およびLPGをそれぞれ定量した。リン脂質の定量は過マンガン酸塩灰化法によるリンの検出値から算出した。LPGの定量はイアトロスキャン(イアトロン社製)を用いて行った。すなわちシリカを塗布したロッド上を実施例5に記載の展開溶媒を用いて抽出脂質を展開、分離後、水素炎イオン化検出器にて検出を行った。定量値に基づき、微生物抽出脂質中のリン脂質およびLPGの含量を算出した。

【0046】結果を第1表に示す。

【0047】

【表1】

第3表

平均粒径 [nm]		
pH	BEL	lys o-PC
4	411	739
5	352	660
6	330	610
7	353	533

【0056】第3表に示されるとおり、バチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-BD）を用いて調製した乳化液は、pHによらずほぼ一定の平均粒径のエマルジョンを形成した。一方、大豆リゾレシチン（lys o-PC）を用いて調製した乳化液は、酸性下で平均粒径が大きいエマルジョンを形成した。

【0057】試験例4

緩衝液として10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）の代わりに10 mM酢酸緩衝液（pH 4.0）を用い、比較対照として実施例2で得られたバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-Et）および比較例1で得られたバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-Hex）をそれぞれ用いる以外は試験例2と同様な方法を用いて、乳化液の調製および平均粒径の測定を行った。結果を第4表に示す。

【0058】

【表4】

第4表

平均粒径 [nm]	
BEL-BD	355
BEL-Et	445
BEL-Hex	—

【0059】第4表に示されるとおり、極性溶媒を用いて抽出されたバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-BD、BEL-Et）を用いて調製した乳化液は、平均粒径の小さいエマルジョンを形成した。一方、ヘキサンを用いて抽出された脂質（BEL-Hex）を用いて調製した乳化液は、エマルジョンを形成しなかった。

【0060】試験例5

緩衝液として10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）の代わりに10 mM酢酸緩衝液（pH 4.0）を用い、比較対照として実施例3で得られたストレプトコッカス・フェカリス抽出脂質（SEL-Et）、比較例2で得られた大腸菌抽出脂質（EEL-Et）および比較例3で得られた酵母抽出脂質（YEL-Et）をそれぞれ10 mgを用いる以外は試験例2と同様な方法を用いて、乳化

液の調製および平均粒径の測定を行った。結果を第5表に示す。

【0061】

【表5】

第5表

平均粒径 [nm]	
BEL-BD	543
SEL-Et	559
EEL-Et	666
YEL-Et	1150

【0062】第5表に示されるとおり、塩基性リン脂質であるLPGを含有するバチルス・ズブチルス（BEL-BD）およびストレプトコッカス・フェカリス抽出脂質（SEL-Et）をそれぞれ用いて調製した乳化液は、LPGを含有しない大腸菌抽出脂質（EEL-Et）および酵母抽出脂質（YEL-Et）をそれぞれ用いて調製した乳化液と比較し、平均粒径の小さいエマルジョンを形成した。

【0063】試験例6

比較対照として実施例4で得られた酵素処理バチルス・ズブチルス抽出脂質（lys oBEL-Et）を用いる以外は試験例5と同様な方法を用いて、乳化液の調製および平均粒径の測定を行った。結果を第6表に示す。

【0064】

【表6】

第6表

平均粒径 [nm]	
BEL-Et	543
lys oBEL-Et	529

【0065】第6表に示されるとおり、酵素処理バチルス・ズブチルス抽出脂質（lys oBEL-Et）を用いて調製した乳化液は、バチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-Et）を用いて調製した乳化液と比較し平均粒径の小さいエマルジョンを形成した。

【0066】試験例7

澱粉ゲルを調製し、澱粉の老化に伴うゲルの硬化を抑制する度合から、澱粉老化抑制活性を評価した。30%小麦澱粉分散液（pH 4.0）に、小麦澱粉に対して1.0%となるように実施例1で得られたバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-BD）を、0.17%となるようにキサンタンガムを添加し、これらを100°Cで10分間加熱して糊化させた。比較対照として、BEL-BDの添加に代えて実施例4で得られた酵素処理バチルス・ズブチルス抽出脂質（lys oBEL-Et）を添加

するか、微生物抽出脂質を添加しない（無添加）で、小麦澱粉をそれぞれ糊化させた。

【0067】澱粉を糊化した後、常温になるまで放冷してゲル化させて澱粉ゲルを取得した。澱粉ゲルを4°Cで4時間保存した後、レオナーRE-3305（山電社製）を用い、直径5.0mmのプランジャーによる貫入破断試験を行い、破断応力を評価した。結果を第7表に示す。

【0068】

【表7】

第7表

破断応力 × 10 ⁻⁴ [mN/m ²]	
無添加	8.33
BEL-BD	7.14
lysobel-BD	6.88

【0069】第7表に示されるように、バチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-BD）およびその酵素処理物（lysobel-BD）を添加して得られる澱粉ゲルで硬化抑制効果、すなわち澱粉の老化抑制効果が認められた。

【0070】試験例8

96穴マイクロプレートに第8表に示す組成の培地180μlに、4.8mg/mlバチルス・ズブチルス抽出脂質（BEL-BD）溶液10μlおよび第8表に示す微生物の菌体溶液10μlをそれぞれ添加して培養後、培養液について濁度、すなわち660nmの吸光度を測定した。

【0071】

【表8】

第8表

	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>Z. rouxii</i>
用培地	用培地	用培地	用培地
ペプトン	10	10	5
グルコース	—	—	10
肉エキス	—	10	—
酵母エキス	2	—	3
麦芽エキス	—	—	3
MgSO ₄ 7H ₂ O	1	3	—
	pH7.0	pH7.2	pH6.0

単位 [g/liter 蒸留水]

E. coli: 大腸菌 (*Escherichia coli*)

E. cloacae: エンテロバクター・クロウカ

(*Enterobacter cloacae*)

Z. rouxii: ジゴサッカロマイセス・ロキシー

(*Zygosaccharomyces rouxii*)

【0072】無添加培養液の濁度に対するBEL-BD添加培養液の濁度の百分率で表わすことにより、微生物の増殖抑制の程度を評価した。なお、比較対照として、BEL-BDの添加に代えてホスファチジルグリセロール(PG)を培養液に等重量を添加して、微生物の増殖抑制の程度を評価した。結果を第9表に示す。

【0073】

【表9】

第9表

	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>Z. rouxii</i>
PG	80.3	88.7	93.6
BEL-BD	48.2	59.6	19.1

単位 [%]

【0074】第9表に示されるとおり、BEL-BDを2.4%添加することにより、大腸菌、エンテロバクター・クロウカおよび酵母であるジゴサッカロマイセス・ロキシーの増殖を抑制した。

【0075】

【発明の効果】本発明によれば、天然物由来の塩基性リン脂質を含む微生物抽出脂質、ならびに該リン脂質を含有する界面活性剤、特に乳化剤、澱粉老化抑制剤、抗微生物剤およびリポソーム基材を提供することができる。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B064 AE63 CA02 CA21 DA01 DA10
DA20
4D077 AA04 AA09 AB08 AB10 AB11
AB12 AC01 CA02 CA03 CA16
DA02Y DC68Y
4H011 AA02 BB21 DA16
4H050 AA01 AA02 AA03 AB68 AB83
BB12 BB14 BB15 BB16 BB42